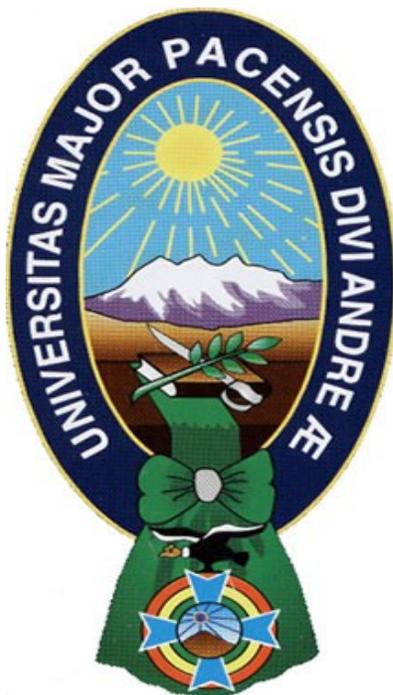


UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE SERVICIO DE LABORATORIO EN DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIÓN EN
SALUD



**DETECCIÓN DE *Listeria monocytógenes*
EN QUESO FRESCO: VERIFICACIÓN DEL MÉTODO
INTERNATIONAL STANDARD ISO 11290**

(Tesis para optar el grado de Especialidad en Diagnóstico de Laboratorio en Salud,
Mención Microbiología)

POSTULANTE: Lic. PAULA ANDREA PANIAGUA LUNA

ASESOR: Dra. ANGÉLICA ESPADA

LA PAZ – BOLIVIA
2016

DEDICATORIA

*A Dios por darme las fuerzas que necesitaba para concluir la tesis, por
levantarme en cada caída y mantenerme de pie.
A mi madre, por ser el pilar más importante en mi vida
A mi padre (†) por haberme dejado una herencia valiosa, mi profesión.
A mi hermano Álvaro, por ser el ejemplo de superación a seguir.
Y a mi hermano Daniel, por ser mi compañero leal.*

AGRADECIMIENTOS

*Un agradecimiento especial al Instituto SELADIS por haberme formado
como profesional.*

*A la Dra. Angélica Espada, por haber puesto su confianza en mi persona y
por transmitirme sus conocimientos.*

*A mis tribunales, la Dra. Romina Segurondo y Dra. Raquel Calderón por
dedicar su tiempo en la corrección del presente trabajo.*

*Y como no mencionar a quienes ocupan un lugar muy importante en mi
vida, quienes acompañan mis tristezas y alegrías, Angela, Wendy, Sandra,
Jorge y Julio, de quienes comprendí la verdadera definición de amistad y
amor.*

A todos ellos, infinitamente gracias.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	6
3. JUSTIFICACIÓN.....	8
4. OBJETIVOS.....	9
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	9
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
5. DISEÑO TEÓRICO.....	10
5.1 MARCO REFERENCIAL.....	10
5.1.1 ANTECEDENTES.....	10
5.2 MARCO TEÓRICO.....	13
5.2.2 Taxonomía.....	13
5.2.3 Factores que afectan al crecimiento y supervivencia de L. monocytogenes.....	14
5.2.4 Hábitat.....	15
5.2.5 Formación de Biofilm o película superficial.....	16
5.2.6 Características morfológicas y bioquímicas.....	17
5.2.7 Dosis infectante.....	19
5.2.8 Serotipificación.....	20
5.2.9 Patogenia e inmunidad.....	21
5.2.10 Características clínicas de la enfermedad.....	23
5.2.10.1 Listeriosis no invasiva.....	23
5.2.10.2 Listeriosis invasiva.....	23

5.2.10.2.1 Enfermedad gestacional y neonatal.....	23
5.2.10.2.2 Bacteriemia.....	24
5.2.10.2.3 Infección del Sistema Nervioso Central.....	25
5.2.11 Alimentos implicados.....	25
5.2.11.1 Origen de la contaminación microbiológica de la leche y productos lácteos... ..	28
5.2.12 Control y prevención de la listeriosis de origen alimentario.....	30
5.2.12.1 Explotaciones ganaderas.....	32
5.2.12.2 Transporte.....	32
5.2.12.3 Plantas de procesado.....	33
5.2.12.4 Almacenamiento.....	33
5.2.12.5 Distribución y puntos de venta.....	34
5.2.12.6 Consumidores.....	34
6. DISEÑO METODOLÓGICO.....	35
6.1 Lugar de estudio.....	35
6.2 Recolección de muestras para el estudio.....	35
6.3 Tipo de estudio.....	35
6.4 Procedimiento.....	35
6.4.1 Principio del método.....	37
6.4.1.1 Enriquecimiento primario.....	37
6.4.1.2 Enriquecimiento secundario.....	37
6.4.1.3 Estriado en placa e identificación.....	38
6.4.1.3.1 Chromogenic Listeria Agar ISO Base.....	38
6.4.1.3.2 Agar Oxford.....	38
6.4.1.4 Aislamiento.....	39

6.4.1.5 Confirmación.....	39
6.5 Limite de detección.	40
6.6 Verificación del método.	41
7. MATERIAL Y EQUIPOS.....	42
8. RESULTADOS.	43
9. DISCUSIÓN.....	47
10. CONCLUSIONES.....	50
11. RECOMENDACIONES.....	51
12. BIBLIOGRAFÍA.	53
ANEXO 1	57
Composición de medios de cultivo	57
ANEXO 2	60
Formulario de Registro de Datos Analíticos.....	60
ANEXO 3	62
Fotografías de medios de cultivo y pruebas confirmatorias	62

INDICE DE TABLAS

Tabla N° 1. Valores óptimos de crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i>	14
Tabla N° 2. Comparación entre <i>Listeria monocytógenes</i> y otras especies representativas del género Listeria.....	19
Tabla N° 3. Serología de las diferentes especies de Listeria.....	20
Tabla N° 4. Factores de contaminación y diseminación de <i>Listeria monocytogenes</i> en la elaboración de quesos.....	29
Tabla N° 5. Determinación del límite de detección del método International standard ISO 11290 para la detección de <i>Listeria monocytogenes</i> en queso fresco fortificado.....	43
Tabla N° 6. Presencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en queso fresco sin fortificar, recolectado del mercado Rodriguez de la ciudad de La Paz.....	45
Tabla N° 7. Composición de Caldo Fraser.....	58
Tabla N° 8. Composición de Chromogenic Listeria Agar ISO Base.....	58
Tabla N° 9. Composición agar OXFORD.....	59
Tabla N° 10. Composición de agar Soya Tripticasa Extracto de Levadura.....	59

INDICE DE FIGURAS

Figura N° 1. Proceso de formación de biofilms.....	17
Figura N° 2. Tinción GRAM de <i>Listeria monocytogenes</i>	18
Figura N° 3. Mecanismo patogénicos de <i>Listeria monocytogenes</i>	22
Figura N° 4. Presencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en queso fresco fresco sin fortificar, colectados del mercado Rodríguez de la ciudad de La Paz.....	46

DETECCIÓN DE *Listeria monocytógenes* EN QUESO FRESCO: VERIFICACIÓN DEL MÉTODO INTERNATIONAL STANDARD ISO 11290

RESUMEN.

La listeriosis es una de las enfermedades más importantes de transmisión por alimentos. Las manifestaciones de la enfermedad en el hombre comprenden septicemia, meningitis y encefalitis, habitualmente precedidas de síntomas parecidos a los de la gripe, incluida la fiebre. Los ancianos, las mujeres gestantes, los recién nacidos y los individuos inmunodeprimidos se consideran un grupo de alto riesgo de contraer la enfermedad.

Existen diversos métodos para la detección de *Listeria monocytógenes*, sin embargo, el método microbiológico convencional continúa siendo el “Gold Standard” para la comparación de otros métodos.

En el presente trabajo, se realizó la verificación del método International Standard ISO 11290 para la detección de *Listeria monocytógenes* en quesos frescos elaborados artesanalmente, en condiciones propias del laboratorio de Microbiología de Alimentos del Instituto SELADIS, siguiendo las etapas de pre-enriquecimiento, enriquecimiento, aislamiento e identificación bioquímica del agente de interés, en donde se logró detectar la presencia de *Listeria monocytógenes* en 30 muestras de quesos frescos, recolectados del mercado Rodríguez de la ciudad de La Paz - Bolivia, con un hallazgo del 3.3% de muestras contaminadas naturalmente por el agente de interés, es decir, un caso. Considerando que el método es capaz de detectar una concentración de igual o mayor número a 6 UFC/25 g del analito en cuestión.

DETECTION OF *Listeria monocytógenes* IN FRESH CHEESE: VERIFICATION OF THE METHOD INTERNATIONAL STANDARD ISO 11290

SUMMARY.

Listeriosis is one of the most important food-borne diseases. The manifestations of the disease in humans include septicemia, meningitis and encephalitis, usually preceded by similar to flu symptoms, including fever. The elderly, pregnant women, newborns and immunocompromised individuals are considered a high risk group for the disease.

There are several methods for the detection of *Listeria monocytógenes*, however, traditional microbiological remains the "gold standard" for comparison of other methods.

In this paper, verification of the International Standard ISO 11290 method for detection of *Listeria monocytógenes* in fresh cheeses made by hand, in conditions of the laboratory of Food Microbiology of SELADIS Institute was held, following the steps of pre-enrichment, enrichment, isolation and biochemical identification of the agent of interest, where they failed to detect the presence of *Listeria monocytógenes* in 30 samples of fresh cheeses, collected from the market Rodriguez of the city of La Paz - Bolivia, with a finding of 3.3% of naturally contaminated samples by the agent of interest, ie a case. Whereas the method is capable of detecting a concentration equal or greater number 6 CFU / 25 g of the analyte in question

DETECCIÓN DE *Listeria monocytógenes* EN QUESO FRESCO: VERIFICACIÓN DEL MÉTODO INTERNATIONAL STANDARD ISO 11290

1. INTRODUCCIÓN.

La especie *Listeria monocytógenes* es un importante patógeno intracelular de transmisión alimentaria que produce en humanos y animales una infección denominada Listeriosis. Durante muchos años, fué considerado sólo patógeno de animales, sin embargo, su papel significativo como patógeno humano transmitido por alimentos se hace evidente a partir de 1980, cuando comienzan a aparecer informes documentados de brotes de listeriosis por consumo de alimentos contaminados.^{1,2}

Las explicaciones posibles de la emergencia de la listeriosis humana transmitida por alimentos, como un asunto de máximo interés de Salud Pública, comprenden cambios importantes en la producción, procesamiento, distribución de los alimentos, utilización cada vez mayor de la refrigeración como medio de conservación primaria de los alimentos, cambios en hábitos alimentarios de la población, particularmente respecto a la disponibilidad de los alimentos ya preparados y un incremento del número de personas consideradas de alto riesgo de sufrir la enfermedad, como ser: personas mayores de sesenta años de edad, mujeres embarazadas, niños recién nacidos y todas aquellas personas con un sistema inmunitario comprometido.¹

Las manifestaciones clínicas de la listeriosis ocurren solo cuando la infección se ha diseminado en todo el organismo, sobrevienen síntomas semejantes a procesos gripales, gastrointestinales como náuseas, dolor abdominal, diarrea y fiebre, (infección no invasora). Entre otras afecciones se encuentran la

septicemia, meningitis o meningoencefalitis, encefalitis, e infecciones intrauterinas o cervicales en mujeres embarazadas (infección invasora), que pueden dar lugar al aborto espontáneo durante el primer trimestre o provocar la muerte del feto al momento del parto. A diferencia de otras infecciones transmitidas por alimentos tiene una alta tasa de mortalidad de alrededor del 23% y este es uno de los motivos que concita su interés puesto que *Listeria monocytógenes* es el principal patógeno para humanos del género *Listeria*.³

Haciendo mención a los alimentos involucrados en la transmisión de la enfermedad, la leche, queso, mantequilla, carne de res, carne de cerdo, carne de aves, vegetales, productos del mar y particularmente los productos listos para consumo se han constituido en vehículos de brotes esporádicos y epidemias de listeriosis, por lo que, los estándares microbiológicos de la FDA (Food and Drug Administration) han establecido un nivel cero tolerancia (0 UFC/25 g de alimento) para *Listeria monocytógenes* en muestras de alimentos.^{4,5} Por ello, la prevención y control de estas enfermedades son una de las metas de salud pública internacional a través del establecimiento de parámetros como los Criterios Microbiológicos (CM), que reflejan el conocimiento y la experiencia de las Buenas Prácticas de Higiene (BPH) y el impacto a la salud humana debido a los posibles peligros.⁵

La detección rápida de *Listeria monocytógenes* y otras especies de *Listeria* en muestras de alimentos es a menudo difícil debido a la flora acompañante competitiva, por lo que se han desarrollado métodos convencionales, que implican tres etapas principales: enriquecimiento selectivo, aislamiento en medios selectivos e identificación y confirmación bioquímica, sin embargo, el éxito de estas etapas depende de la concentración y el grado de estrés celular del microorganismo en la muestra estudiada, la selectividad de los medios de cultivo y las condiciones de tiempo y temperatura de incubación.⁶

Como consecuencia del impacto de esta enfermedad en Salud Pública nace la necesidad de realizar la verificación del método horizontal International Standard ISO 11290 para la detección de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos (elaborados artesanalmente) e implementar el método en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Instituto SELADIS, con el objeto de coadyuvar con el control y vigilancia de este agente.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) continúan siendo una amenaza a la salud pública en todo el mundo y son causa importante de morbilidad-mortalidad pudiendo presentarse como cuadros leves que asocian a síntomas gastrointestinales agudos (diarrea y vómito), en otras ocasiones puede ser mucho más severa y peligrosa. ⁵

La Organización Mundial de la Salud (OMS), ha notificado seis patógenos principales que se encuentran involucrados en Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA's) y son: *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella spp*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*, los cuales son causantes entre 3.3 a 12.3 millones de casos y alrededor de 3,900 muertes por año. ^{3,5}

Listeria monocytogenes es de gran importancia entre los patógenos emergentes asociados a las ETA's, debido a su amplia distribución en la naturaleza habiendo sido aislada de varias especies de animales y una amplia variedad de productos alimenticios frescos y procesados, como la leche cruda no pasteurizada, leche en polvo, quesos, helados, alimentos listos para su consumo, productos cárnicos, entre otros. ³

En los últimos años se han desarrollado distintos métodos para el análisis e identificación de *Listeria monocytogenes* en alimentos y muestras ambientales, sin embargo, este método microbiológico convencional se constituye en el Gold Standard para muchos estudios. El método incluye procedimientos de enriquecimiento seguido por la siembra en un agar selectivos para su posterior identificación bioquímica.

Es así que, con el propósito de coadyuvar a la industria alimentaria y organismos de control y vigilancia, como el Servicio Nacional de Sanidad Agropecuaria e Inocuidad Alimentaria (SENASAG), Servicio Departamental de Salud (SEDES) y el Instituto Nacional de Seguros de Salud (INASES), el laboratorio de Microbiología de Alimentos del Instituto SELADIS ha propuesto verificar un método International Standard ISO – método horizontal, para la detección de *Listeria monocytógenes* en queso fresco y de esta forma ampliar la gama de oferta de análisis microbiológico en alimentos.

3. JUSTIFICACIÓN.

Listeria monocytógenes es reconocida como un microorganismo importante, asociado a enfermedades transmitidas por alimentos pudiendo ocasionar graves daños a la salud, especialmente en grupos de riesgo como mujeres embarazadas, niños, ancianos y personas inmunodeprimidas.¹

Entre muchos de los alimentos considerados como vehículo para la transmisión de *Listeria monocytógenes*, el queso fresco es considerado altamente riesgoso, puesto que es comúnmente consumido en la dieta diaria, es elaborado a partir de leche cruda de vaca (fresca) siguiendo esquemas artesanales empíricos, no estandarizados, lo que, aunado con la pobre calidad sanitaria y otros factores como: distribución y comercialización, no sujeta a controles, almacenamiento sin refrigeración o refrigeración no controlada convierten a este alimento en un potencial vehículo para la transmisión de importantes patógenos. Además que su alto contenido de humedad, alta disponibilidad de nutrientes, concentración de sal de 1-3%, el hecho de que se consume, en muchos casos, sin sufrir ningún tratamiento térmico y conservado por periodos prolongados a temperatura de refrigeración, hace que éste alimento sea más vulnerable para la contaminación por *Listeria*.⁷

Debido a la importancia actual en salud pública de este microorganismo, al limitado número de investigaciones en torno a ella y al considerarse un requisito microbiológico en una variedad de alimentos según el Instituto de Normalización Boliviana (IBNORCA), se consideró necesario verificar el método International Standar ISO 11290 para la detección de *Listeria monocytógenes* en queso fresco, bajo las condiciones propias del laboratorio de Microbiología de Alimentos del Instituto SELADIS.

4. OBJETIVOS.

4.1 OBJETIVO GENERAL.

Verificar el método International Standard ISO 11290 para la detección de *Listeria monocytógenes* en queso fresco elaborados artesanalmente.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Determinar el Límite de detección del método International Standard ISO 11290.
- Determinar el porcentaje de recuperación del analito en la matriz seleccionada.
- Aplicar el método ISO 11290 para determinar la presencia de *Listeria monocytógenes* en queso fresco.

5. DISEÑO TEÓRICO.

5.1 MARCO REFERENCIAL.

5.1.1 ANTECEDENTES.

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) y particularmente de los alimentos de alto riesgo como la leche y sus derivados, se han convertido en un asunto de importancia estratégica por el impacto económico y social que pueden ocasionar. El control de enfermedades ocasionado por *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytógenes* además de otras toxinas, aflatoxinas y otros potenciales microorganismos patógenos en los productos lácteos, se convierten en un tema de especial importancia en los sectores productivos y que deben dedicar especial atención.⁵

En América Latina, las enfermedades transmitidas por alimentos representan alrededor del 70 % de los casos de enfermedad diarreica aguda, según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS). De los brotes con información de laboratorio, el 45% fue causada por bacterias, el 21% por virus y 20% por toxinas. El restante 14%, se distribuye entre parásitos, contaminantes químicos y otras toxinas.^{1,5}

En Bolivia, las Enfermedades Diarreicas Agudas (EDAs), son una de las tres principales causas de muerte en niños menores de 5 años por la ingestión de alimentos como la leche y derivados, cárnicos y agua contaminados con patógenos. El 2011, se registraron 24.438 casos en niños menores de 1 año, 375.366 casos en niños de 1 a 5 años y 827.965 personas fueron afectadas por Enfermedades Diarreicas Agudas (EDAs).⁸

De manera típica *Listeria monocytógenes* es de incidencia esporádica y su distribución es mundial. Ha sido aislada del suelo, agua, de vegetales en descomposición y ensilajes, así como también de seres humanos con la enfermedad, de portadores sanos y de un amplio espectro de otros mamíferos.²

En nuestro medio, no existen estudios al respecto, sin embargo, una de las pocas investigaciones relacionado con el presente trabajo, es el realizado en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del INLASA de la ciudad de La Paz, durante la gestión 2004, donde se realizó el aislamiento de *Listeria monocytógenes* en leche y queso fresco, mediante el método microbiológico convencional según la técnica USDA-FSIS, encontrando 13 muestras positivas para *Listeria monocytógenes* de un total de de 70 muestras analizadas entre leches y quesos frescos.⁹

En una investigación realizada en Maracaibo y San Francisco del estado Zulia, Venezuela, en el año 2009 donde se analizaron 48 muestras de queso empleando agar PALCAM y OXFORD, 7 (15%) fueron positivas para el género *Listeria* spp. Las pruebas preliminares (microscópicas y bioquímicas) confirmaron 11 colonias con características del género *Listeria*. De las once colonias fueron identificadas 5 como *Listeria welshimeri* (46%), 3 como *Listeria grayi* (27%), 2 como *Listeria innocua* (18%) y 1 cepa como *Listeria monocytógenes* (9%).¹⁰

Durante la gestión 2010, un estudio realizado en la Universidad de Carabobo – Venezuela, se sometieron al análisis 30 muestras de queso blanco empleando agar PALCAM, de las cuales 8 mostraron crecimiento presuntivo de *Listeria* spp. Sin embargo, 2 de ellas no pertenecían al género *Listeria*, en las 6

restantes las pruebas de confirmación arrojaron que: 2 eran *Listeria monocytógenes*, 3 *Listeria ivanovii* y 1 *Listeria seeligeri*.¹¹

Otro estudio de investigación realizada en Perú, provincia de Trujillo, durante la gestión 2012, evaluó 60 muestras de leche fresca y 60 muestras de queso fresco, de las cuales no se encontró *Listeria monocytógenes* en leche fresca. Sin embargo, en queso fresco su presencia fue de 3,34 %.¹²

Durante la misma gestión, la Secretaria Regional Ministerial de Salud de Chile, anuncia brote de listeriosis debido al consumo de quesos blandos Camembert de la marca Santa Rosa, la cual fue retirada del mercado nacional alrededor de 2000 quesos de la mencionada marca. Posteriormente el ministerio de Salud señaló que de las 89 personas infectadas, 5 llegaron a fallecer por esta enfermedad, entre las que se cuentan 3 mujeres embarazadas y 2 adultos mayores.¹³

En el año 2013, un estudio realizado en la ciudad de Guayaquil, Ecuador indica que los productos lácteos de alta demanda, como los quesos, son los principales involucrados en casos de intoxicación e infecciones alimentarias causadas, en su gran mayoría, por agentes microbianos como Salmonella y Listeria. Es así que de los resultados obtenidos en 51 quesos frescos se logra evidenciar la presencia de Salmonella spp. en 8 muestras y para el caso de Listeria spp, se logró detectar presencia en 4 muestras.¹⁴

En el año 2014, otro estudio realizado en Guatemala, refiere que de un total de 42 muestras de queso fresco artesanal que se comercializaban en mercados municipales de la ciudad, se determinó la presencia de *Listeria monocytógenes*

en 13 muestras y en 20 muestras, se observaron colonias típicas a *Listeria* spp.¹⁵

5.2 MARCO TEÓRICO.

5.2.1 Reseña histórica.

Listeria debe su nombre en honor a Joseph Lister (1827-1912), por James Hunter Harvey Pirie (1877-1965), bacteriólogo y geólogo escocés, que identificó la bacteria en 1927 y la denominó como *Listerella hepatolytica*. La identificación de la bacteria ya se había realizado un año antes (1926) por parte de tres microbiólogos de Cambridge (Murray, Webb y Swann) y que ellos denominaron *Bacterium monocytogenes*. La bacteria cambió de nombre en diferentes ocasiones, pasando por los nombres de *Bacterium monocytogenes hominis* (Nyfeldt - 1932), *Corynebacterium parvulum* (Schultz -1934), *Erysipelothrix monocytogenes* (Miles y Wilson - 1946), *Corynebacterium infantisepticum* (Potel - 1950), para terminar en 1957 con la designación *Listeria monocytogenes* realizada por Heinz Seeliger en recuerdo de la nomenclatura de Pirie.^{2,3}

5.2.2 Taxonomía.

La clasificación taxonómica de *Listeria monocytogenes* es:

Dominio: Bacteria

Filo: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Bacillales

Familia: Listeriaceae

Género: *Listeria*.

Especie: *monocytógenes* (como la más patógena) y otras especies.¹⁶

5.2.3 Factores que afectan al crecimiento y supervivencia de *Listeria monocytógenes*.

El crecimiento de *Listeria monocytógenes* en los alimentos depende de las características intrínsecas del alimento, como: temperatura, pH, actividad del agua (Tabla N°1), de las características extrínsecas del alimento: temperatura de almacenamiento, humedad relativa y de las prácticas de manufactura empleadas en su elaboración, como ser la pasteurización.¹⁸

Tabla N° 1. Valores óptimos de crecimiento de *Listeria monocytógenes*

PARÁMETRO	MÍNIMO	SOBREVIVENCIA	MÁXIMO
Temperatura	- 1,5 a 3 °C	30 - 37 °C	45 °C
pH	4,0	4,0 – 7 °C	9,4 – 9,6
Actividad de agua (Aw)	< 0,89	0,90 a 0,97	> 0,99
Sal (% NaCl)	< 0,5	-	12 - 16

Nota. Los valores se refieren a condiciones óptimas de crecimiento dado en laboratorio.

Fuente. Condiciones que determinan el crecimiento y la supervivencia de *Listeria monocytógenes* en alimentos listos para consumo.¹⁸

Los principales factores limitantes en la supervivencia y multiplicación de *Listeria monocytógenes* en los alimentos son la temperatura, pH y la actividad

de agua (A_w). Como otras bacterias, la tolerancia de *Listeria monocytógenes* a ciertas condiciones ambientales (condiciones del procesado y/o del almacenamiento del alimento) es mayor cuando todas las condiciones son óptimas para su crecimiento. Sin embargo, a diferencia de otras bacterias, se ha constatado que células de *Listeria monocytógenes*, que han soportado condiciones adversas (como temperaturas subletales para la bacteria previas a un tratamiento térmico), pueden volverse más resistentes a condiciones extremas.^{18,19} Es así que la tolerancia de *Listeria monocytógenes* al frío y su capacidad para crecer a temperaturas de refrigeración es uno de los principales problemas para la industria alimentaria.

5.2.4 Hábitat.

La capacidad de *Listeria monocytógenes* para sobrevivir y desarrollarse en una variedad de condiciones (pH, temperatura, salinidad, etc.), hacen posible la amplia distribución de este microorganismo en el ambiente. Puede encontrarse como saprófito en el suelo y plantas, o bien en ambientes acuáticos como: aguas limpias, ríos, lagos y lugares en donde la población celular es alta como el fango, aguas residuales y vegetación en descomposición donde, la presencia del microorganismo es probablemente debida a la contaminación fecal, así como en el ambiente de elaboración de alimentos.²⁰

Esta extraordinaria ubicuidad, además de su capacidad para crecer a temperaturas de refrigeración, pH bajo y tolerancia hacia agentes conservadores como el cloruro de sodio y nitrato de sodio, han permitido la incorporación de *Listeria monocytógenes* en diferentes alimentos tanto crudos como procesados que van desde vegetales, carne, mariscos, leche y sus

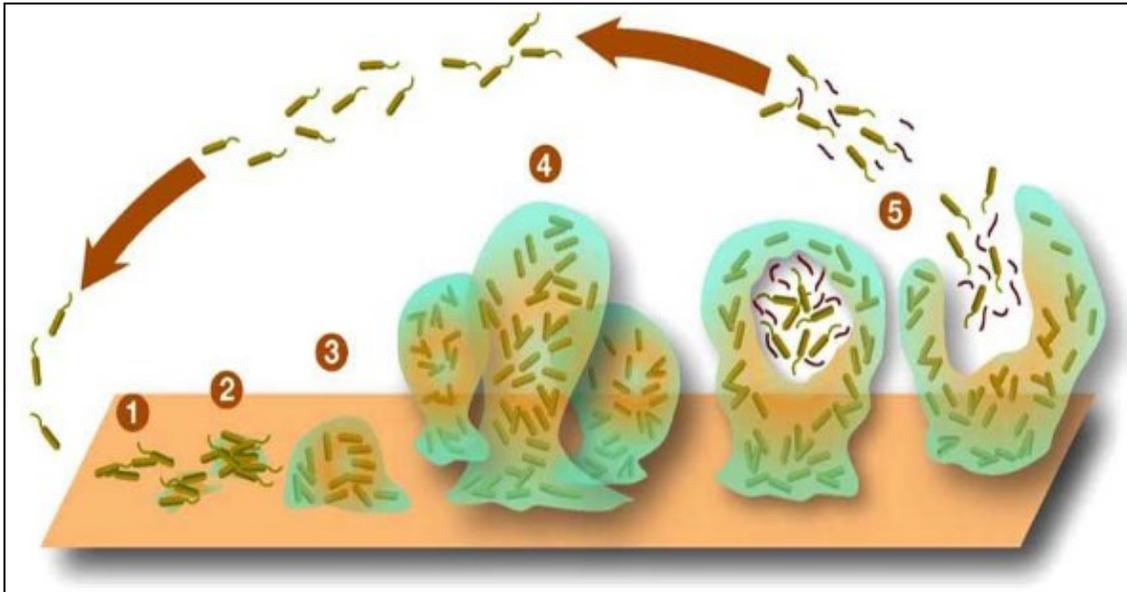
derivados, hasta productos ahumados, congelados precocinados y pasteurizados.^{19,20}

5.2.5 Formación de Biofilm o película superficial.

En la industria alimentaria es muy común la presencia de biofilms en conducciones, equipos y materiales ya que pueden formarse en cualquier tipo de superficie, incluyendo plástico, cristal, madera, metal y sobre los alimentos. Estas formaciones pueden contener microorganismos patógenos y presentan una mayor resistencia a la desinfección por lo que incrementan las probabilidades de contaminación del producto.²¹

Es así que *Listeria monocytógenes* posee la capacidad de adherirse a las superficies y crecer, formando colonias protegidas por una capa formada por polisacáridos extracelulares denominada biofilm (Figura N°1). De este modo es más resistente a los agentes químicos y físicos y puede sobrevivir por largos periodos con aportes mínimos de nutrientes. La localización de estas colonias protegidas por biofilm en áreas de difícil visibilidad y acceso para su limpieza hace que *Listeria monocytógenes* pueda sobrevivir como foco continuo de contaminación de alimentos.²¹

Figura N° 1. Proceso de formación del biofilm. (1) Adhesión de las células a la superficie; (2) Formación de microcolonias, (3) Producción del exopolisacárido extracelular; (4) Maduración de la película; (5) Dispersión de las células formadoras del biofilm.

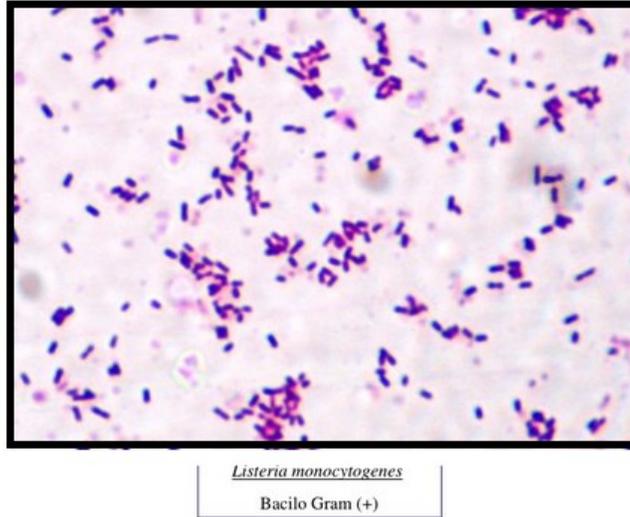


Fuente. Importancia del control higiénico de las superficies alimentarias mediante técnicas rápidas y tradicionales para evitar y/o minimizar la contaminación cruzada.²¹

5.2.6 Características morfológicas y bioquímicas.

Listeria monocytógenes aplicando tinción Gram se observa como bacilo grampositivo corto, regular, con tendencia a presentarse en cadenas cortas de tres a cinco microorganismos (Figura N° 2), no esporulado, presentan de uno a cinco flagelos peritricos que les confieren una movilidad característica en forma de sombrilla, crece con facilidad en medios enriquecidos con sangre de cordero, tras 18 a 24 horas de incubación en aerobiosis, mostrando colonias pequeñas, blanco grisáceas y presentan hemólisis que excede escasamente el borde de la colonia.¹⁶

Figura N° 2. Tinción Gram de *Listeria monocytógenes*



Fuente. <http://cit.vfu.cz/alimentarni-onemocneni/xlm/xlm01.html>

El género *Listeria* incluye siete especies que han sido aisladas del suelo, materia vegetal en putrefacción, aguas residuales, alimentos frescos y procesados, desechos de los mataderos, así como en el tracto digestivo de humanos y animales asintomáticos. Las especies aisladas de este género son: *L. murrayi*, *L. grayi*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri* y *L. monocytogenes*, siendo ésta última la única implicada en patología humana y *L. ivanovii* que es ocasionalmente responsable por abortos en animales.¹⁶

Bioquímicamente, todas las especies del género son catalasa positivo, oxidasa negativo, las reacciones de Voges-Proskauer y Rojo de Metilo son positivas, hidrolizan la esculina en pocas horas pero no la urea, no producen indol ni ácido sulfhídrico y producen ácido a partir de glucosa y otros azúcares como ramnosa, xilosa (Tabla N° 2).^{16,18}

Tabla N° 2. Comparación bioquímica entre *Listeria monocytogenes* y otras especies representativas del género *Listeria*.

PRUEBA	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria ivanovii</i>	<i>Listeria seeligeri</i>	<i>Listeria welshimeri</i>	<i>Listeria grayi</i>
Catalasa	+	+	+	+	+	+
Movilidad a 25 °C	+	-	-	-	-	-
β-hemólisis	+	+	-	-	+	-
Rojo de Metilo	+	+	+	+	+	+
Voges Proskauer	+	+	+	+	+	+
D-Xilosa	-	+	-	+	+	-
L-Ramposa	+	-	Variable	Variable	-	-

Fuente. Condiciones que determinan el crecimiento y la supervivencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para consumo. ¹⁸

5.2.7 Dosis infectante.

La dosis infecciosa de *Listeria monocytogenes* depende de varios factores, que incluyen el estado inmunológico del hospedador y las características propias del microorganismo. La aparición y el curso de la infección pueden depender de los factores de virulencia y de la dosis infecciosa. Debido a la gravedad de la enfermedad, las pruebas con voluntarios humanos son inviables, sin embargo niveles de 10^2 a 10^4 células de *Listeria monocytogenes* por gramo de alimento han sido asociados con listeriosis en humanos, especialmente en pacientes inmunodeprimidos, ancianos y mujeres embarazadas. Sin embargo, aún existen muchas lagunas en la comprensión de la relación dosis-respuesta de la listeriosis humana y del papel que juega la virulencia de la cepa implicada. Por

este motivo, en la actualidad se sigue considerando a todos los aislamientos de *Listeria monocytógenes* igual de patogénicos.^{1,5,23}

5.2.8 Serotipificación.

La heterogeneidad en la virulencia de *Listeria monocytógenes* ha sido observada en estudios in vivo (ratón) y en estudios in vitro (cultivos celulares). Basados en los antígenos somático (O) y flagelar (H), existen hasta el momento, 17 serovariedades. La principal especie patógena, *Listeria monocytógenes* está representada por 13 serovariedades, algunas de las cuales son compartidas por *L. innocua* y *L. seeligeri*. Aunque *L. innocua* está representada solamente por 3 serovariedades, a veces es considerada como la variante apatógena del género (Tabla N°3).²⁴

Tabla N° 3. Serología de las diferentes especies de *Listeria*

Espece	Serovariedad
<i>L. monocytógenes</i>	1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4c, 4d, 4e, 7
<i>L. ivanovii</i>	5
<i>L. innocua</i>	4ab, 6a, 6b
<i>L. weishimeri</i>	6a, 6b
<i>L. seeligeri</i>	1/2b, 4c, 4d, 6b, 1n

Fuente. Patogénesis de *Listeria monocytógenes*, microorganismo zoonótico emergente.²⁴

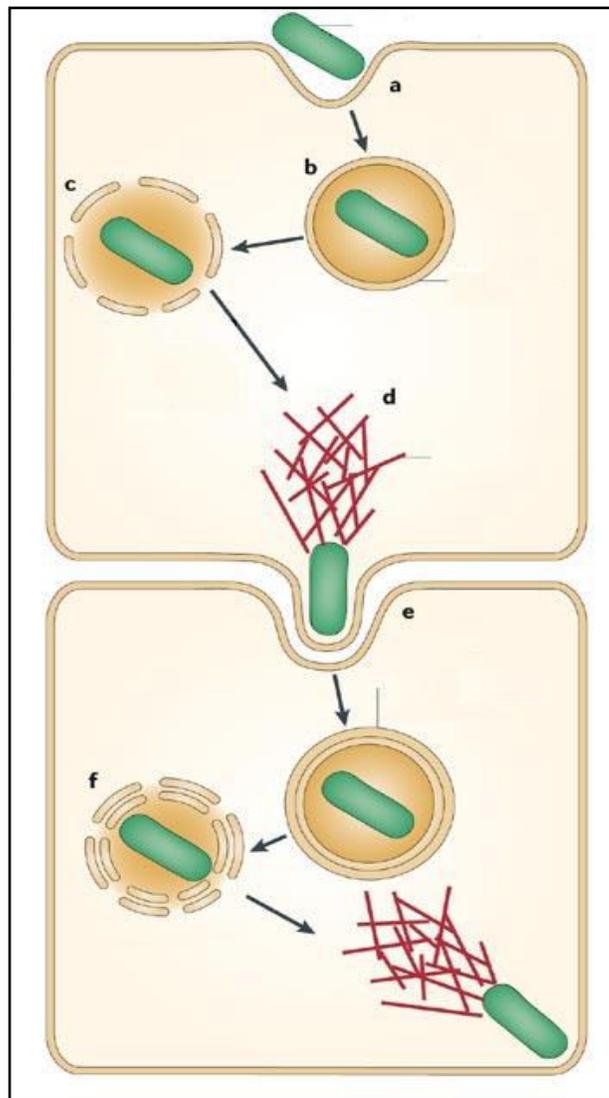
5.2.9 Patogenia e inmunidad.

Nuestro entorno contiene una enorme variedad de agentes infecciosos, por lo que los seres humanos estamos en contacto permanente con una gran cantidad de gérmenes. La mayoría de los agentes infecciosos a los que se ve expuesto un individuo no consiguen penetrar en su organismo, sino que son detenidos por una serie de barreras físicas como la barrera intestinal, la barrera placentaria y la barrera hematoencefálica. Sin embargo algunos microorganismos como *Listeria monocytógenes* han desarrollado diferentes mecanismos que les permiten vulnerar estas barreras.²⁴

Listeria monocytógenes ingresa a la sangre a través del aparato gastrointestinal después de la ingestión de alimentos contaminados. Posee una proteína en la superficie de la pared celular denominada internalina que interacciona con la Caderina E, un receptor sobre las células epiteliales, para promover la fagocitosis al interior de estas. Después de la fagocitosis, la bacteria queda encerrada en un fagolisosoma donde el pH bajo activa la bacteria para producir listeriolisina O. Esta enzima provoca la lisis de la membrana del fagolisosoma y permite a la bacteria escapar hacia el citoplasma de la célula epitelial. Los microorganismos proliferan e inducen la polimerización de actina en las células huésped que los impulsa hacia la membrana celular. Empujan contra la membrana celular huésped y forman prolongaciones alargadas denominadas filópodos. Estos filópodos son ingeridos por las células epiteliales adyacentes, macrófagos y hepatocitos; las listerias se liberan y el ciclo comienza de nuevo. Es así que *Listeria monocytógenes*, puede desplazarse de una célula a otra sin exponerse a anticuerpos, al complemento o células polimorfonucleares.^{2,24}

Figura N° 3. Mecanismo patogénico de *Listeria monocytogenes*.

a. *L. monocytogenes* induce su entrada a fagocitos. **b.** La bacteria es internalizada en una vacuola (fagosoma). **c, d.** La membrana de la vacuola es lisada por la secreción de dos fosfolipasas, PlcA y PlcB, y la toxina formadora de poros listeriolisina O. La bacteria es liberada en el citoplasma, donde se multiplican y comienzan a polimerizar colas de actina, **e.** La polimerización de actina permite que las bacterias se diseminen a células vecinas, mediante la formación de protuberancias en la membrana plasmática. **f.** A la entrada de las células vecinas, la bacteria presenta una vacuola con doble membrana, de la cual puede escapar para repetir el ciclo.



Fuente. <http://publicacionesmedicina.uc.cl/Boletin/20081/AspectosFisiopatologicos.pdf>

5.2.10 Características clínicas de la enfermedad.

Listeria monocytógenes puede causar una variedad de infecciones, aunque la forma de listeriosis más frecuente es la que afecta al útero, torrente sanguíneo o sistema nervioso central.¹⁹ Se estima que entre el 2 y el 6% de los individuos sanos es portador fecal asintomático de *Listeria monocytógenes*, el riesgo de enfermedad clínica en estos individuos se desconoce. Se admite que tenga lugar la infección endógena, especialmente en los enfermos que reciben terapia inmunodepresora, que debilita la resistencia a la infección y altera los mecanismos de defensa intestinal, favoreciendo la invasión del microorganismo.³

5.2.10.1 Listeriosis no invasiva.

Es la forma clínica más habitual. Aparentemente es una causa muy poco frecuente (<1% de los casos) de diarrea febril esporádica. El inóculo necesario para causar enfermedad varía notablemente dependiendo de la cepa y del estado inmunológico del huésped. Aproximadamente 24 horas después de la ingesta del alimento contaminado los pacientes presentan deposiciones acuosas, náuseas, vómitos, cefalea, artromialgias y fiebre, síntomas que suelen limitarse en dos días, salvo que padezcan algún tipo de inmunodepresión.²⁵

5.2.10.2 Listeriosis invasiva.

5.2.10.2.1 Enfermedad gestacional y neonatal.

En las gestantes que experimentan un inmunocompromiso relativo fisiológico y en las que generalmente no se detectan otros factores de riesgo conocidos para sufrir listeriosis, la forma más frecuente de presentación es la fiebre sin foco aparente y con pocos síntomas acompañantes. La mayoría experimentan entre 2 y 6 semanas después de la infección, una bacteriemia que suele cursar con un síndrome pseudogripal leve, con fiebre, escalofríos, artromialgias, lumbalgia, tos, cefalea, mareo o síntomas gastrointestinales (cualquier combinación o uno sólo de estos síntomas y signos).^{25,26}

La gravedad de la listeriosis materna radica en que sobre todo en el tercer trimestre y más aún si el embarazo es múltiple suele seguirse de: aborto, muerte fetal intraútero, mayor tasa de cesáreas, prematuridad, sepsis y muerte neonatal.²⁶

Los neonatos pueden adquirir la infección intraútero o intraparto y sufrir sepsis, microabscesos y granulomas diseminados (granulomatosis infantoséptica), infección respiratoria o meningitis, que se detectan en el nacimiento o entre días y semanas después, y que conllevan una mortalidad y una morbilidad importantes, siendo frecuente la hidrocefalia persistente en el caso de la meningitis. La prematuridad es el principal factor de riesgo. La listeriosis pediátrica, no perinatal, es infrecuente y suele tener mejor pronóstico.²⁶

5.2.10.2.2 Bacteriemia

La forma clínica más frecuente en inmunodeprimidos es la bacteriemia sin foco identificable, que cursa con fiebre, deterioro rápido y a menudo fulminante. El hecho de que sea más frecuente que la meningitis quizá se explique por la

rápida intervención terapéutica empírica en estos pacientes ante la detección de fiebre, y con ello la limitación de la difusión del microorganismo.²⁶

5.2.10.2.3 Infección del Sistema Nervioso Central.

La meningoencefalitis afecta a neonatos (periodo perinatal precoz), adultos mayores de 60 años e inmunodeprimidos, aunque un 30% de los pacientes no tienen factores subyacentes identificables. El espectro clínico oscila entre un cuadro sutil con fiebre y cambios cognitivos, hasta el curso fulminante y coma. El diagnóstico puede verse retardado, ya que más del 40% de los pacientes no tienen signos meníngeos en la presentación que suele ser más atípica e insidiosa que en otras meningitis bacterianas.²⁶

En el líquido cefalorraquídeo puede haber predominio de polimorfonucleares o mononucleares en las formas subagudas. Puede complicarse con encefalitis, diagnosticándose alteraciones de pares craneales, temblor, ataxia, hemiplejía, sordera o convulsiones. La expresión clínica y cefalorraquídea puede ser superponible a la encontrada en las encefalitis tuberculosas o fúngicas. Es muy característica, aunque no patognomónica y tampoco frecuente.^{24,26}

5.2.11 Alimentos implicados.

Listeria monocytógenes puede transmitirse a los humanos a través de la ingestión de alimentos contaminados con la bacteria. Su amplia distribución en el ambiente y su capacidad para crecer en la superficie de la mayoría de alimentos, ofrece a *Listeria monocytógenes* oportunidades abundantes para introducirse en los distintos pasos de la producción alimentaria, siendo ésta la

vía más frecuente por la que el ser humano adquiere la infección. *Listeria monocytógenes* ha sido aislada en una amplia variedad de alimentos frescos y procesados como leche líquida cruda y pasteurizada, leche en polvo, quesos (en especial los elaborados artesanalmente), helados, verduras y legumbres crudas, productos cárnicos.^{3,5} También se encuentra en el suelo, paredes, techos y equipos de plantas de procesamiento de alimentos. Por ello, alimentos potencialmente contaminados por *Listeria* son:

- Alimentos listos para consumo. Los primeros brotes de listeriosis asociados al consumo de hortalizas y quesos frescos al inicio de los años 80 no solamente originaron el reconocimiento de *Listeria monocytógenes* como un microorganismo responsable de toxiinfecciones alimentarias, sino también el papel de algunos alimentos en la transmisión de la enfermedad. Por ello, los alimentos más comúnmente asociados a brotes de listeriosis son los alimentos listos para consumo de origen vegetal, lácteo, cárnico y de pescados, alimentos que se mantienen durante mucho tiempo en refrigeración y alimentos con riesgo de contaminación tras su procesamiento.¹⁹
- Productos cárnicos. La contaminación de la carne y sus productos con *Listeria monocytógenes* se ha puesto de manifiesto en numerosas ocasiones tanto en canales enteras, como despiezadas y lo mismo en las de rumiantes que en las de cerdos y aves. Entre los productos cárnicos más frecuentemente contaminados por este microorganismo se destacan: carne picada, pasta de salami, salchichas de pavo, mortadelas y otros fiambres. La contaminación más frecuente es la superficial, especialmente a nivel de matadero. La carne cruda picada y el paté figuran entre los productos cárnicos con mayor porcentaje de contaminación.^{19,28}

- Leche y derivados lácteos. *Listeria monocytógenes* se ha descrito en leches y derivados lácteos y en plantas de procesado de dichos alimentos, así como en productos pasteurizados y en derivados frescos, probablemente, debido a una recontaminación tras su pasteurización. En el caso de quesos elaborados con leche pasteurizada o no pasteurizada, la ausencia del microorganismo depende de parámetros intrínsecos y extrínsecos del alimento, mientras su presencia es siempre problemática debido a su capacidad extraordinaria de supervivencia en condiciones hostiles.¹⁹
- Pescado fresco, congelado y ahumado. La presencia y supervivencia de *L. monocytógenes* en pescado fresco y congelado es poco probable, mientras en el pescado ahumado es variable dependiendo del método de ahumado (en frío o caliente) empleado pero, en cualquier caso, siempre es preocupante.¹⁹
- Frutas y verduras. Se conoce que hasta el 10-20% de productos vegetales listos para su consumo pueden estar contaminados con *Listeria monocytógenes* incluyendo lechugas, rábanos, tomates, cebollas, pepinos, coliflores. De especial preocupación son los productos ecológicos abonados con estiércol posiblemente contaminado con *Listeria* de animales enfermos.^{19,27}
- Huevos y ovoderivados. Es muy poco frecuente, aunque su contaminación a partir de la cáscara y del equipamiento de las plantas de procesado es posible.¹⁹

5.2.11.1 Origen de la contaminación microbiológica de la leche y productos lácteos.

La leche y productos lácteos son quizás los alimentos en los que más se ha centrado la investigación sobre la contaminación por *Listeria monocytogenes*, debido a la relación de estos productos con los brotes de listeriosis ocurridos en Estados Unidos de América y otros países en años anteriores.²⁹

Cuando la leche sale de la ubre de una vaca sana contiene relativamente pocas bacterias y, generalmente, estas bacterias (micrococos y estreptococos) no se multiplican en la leche que se manipula bajo condiciones asépticas. Sin embargo, durante la operación manual del ordeño, la leche está expuesta a la contaminación por microorganismos del propio animal, sobre todo por los existentes en la parte externa de la ubre y zonas próximas a la misma. Bacterias encontradas en el estiércol, en el suelo y en el agua, pueden llegar a la leche a partir de esta fuente de contaminación. Probablemente, las dos fuentes de contaminación más importantes sean los utensilios que se emplean en el ordeño y las superficies que están en contacto con la leche. Entre las bacterias indeseables que tienen las procedencias mencionadas se incluyen los estreptococos lácticos, las bacterias coliformes, los bacilos psicótrofos gramnegativos, y las bacterias termoturicas.^{6,7}

La leche durante el ordeño, el almacenamiento y el transporte de la granja a la industria, se contamina por una gran variedad de microorganismos. Solo una parte de ellos pueden, si la temperatura y el medio son favorables, multiplicarse en la leche. Todo esto trae como resultado que la naturaleza de la flora microbiana de la leche cruda es muy compleja y variable de una muestra a otra y según al grado de frescura.²⁹

El queso elaborado artesanalmente, por lo tanto, está considerado entre los productos que comúnmente producen enfermedades alimentarias debido a su deficiente calidad microbiológica, puede abarcar todas las etapas de la cadena agroalimentaria por factores como la presencia de mastitis, el deterioro en la infraestructura donde se elaboran los quesos, la contaminación de pisos y/o equipos, deficientes procedimientos de limpieza y de sinfección, presencia de biofilms, temperaturas de almacenamiento inadecuada, contaminación cruzada, entre otros (Tabla 5).³⁰

Tabla N° 4. Factores de contaminación y diseminación de *Listeria monocytógenes* en la elaboración del queso.

ORÍGEN DE LA CONTAMINACIÓN	DESCRIPCIÓN/RECOMENDACIÓN
Materia prima	La leche contaminada con <i>L. monocytógenes</i> puede contaminar equipos. Concentraciones mayores a 10 ⁵ UFC/g de <i>L. monocytógenes</i> en la leche cruda permitirán la sobrevivencia de la bacteria después de la pasteurización.
Instalaciones	<p>En los depósitos de agua, pisos, drenajes y cuartos fríos se favorece la sobrevivencia y persistencia de <i>L. monocytógenes</i> y la posible formación de biofilms. Se deben realizar reparaciones locativas para evitar la formación de depósitos de aguas e implementar un adecuado programa de limpieza y desinfección, para prevenir la formación de biofilms en áreas de producción.</p> <p>Las zonas con alto contenido de humedad favorece la formación de biofilms.</p>
Equipos y utensilios	El uso de materiales porosos favorece la persistencia de <i>L. monocytógenes</i> en las plantas. Los filtros y líneas de conducción son puntos de contaminación. Se deben usar equipos y utensilios de materiales apropiados como acero inoxidable que faciliten la limpieza y desinfección.

	La presencia de <i>L. monocytógenes</i> en el cuarto frío constituye una fuente potencial de recontaminación del producto terminado. En equipos de refrigeración se debe tener control de la calidad microbiológica del agua refrigerante.
Personal	Los manipuladores pueden ser una fuente de diseminación durante el proceso, por contacto directo o indirecto. Deben recibir capacitación permanente sobre buenas prácticas de higiene.
Proceso	Mantener el control de la temperatura y los tiempos de proceso. La refrigeración no impide la multiplicación de <i>L. monocytógenes</i> , pero mientras más baja la temperatura, más lenta será su multiplicación.
	El suero de leche se considera una fuente de contaminación. El exceso de líquido debe ser retirado durante el proceso de prensado.
Limpieza y desinfección	Los procesos de limpieza y desinfección deficientes y/o la ausencia de programas de limpieza y desinfección favorecen la formación de biofilms de <i>L. monocytógenes</i> en superficies que no entran en contacto con el producto como pisos y drenajes y en superficies de contacto como equipos y utensilios. La presencia del microorganismo en medio ambiente contribuye a la contaminación del producto durante el proceso y a la recontaminación de producto terminado. Se debe evitar su formación mediante la aplicación de agentes quelantes y ablandadores, empleando desinfectantes eficaces.

Fuente: Evaluación de riesgos de *Listeria monocytógenes* en queso fresco en Colombia.³⁰

5.2.12 Control y prevención de la listeriosis de origen alimentario.

Listeria monocytógenes se desenvuelve bien en una gran diversidad de hábitats, entre los que se incluyen el suelo, alimentos ensilados del ganado, aguas y aguas residuales, ambientes en los que se obtienen y elaboran alimentos (plantas procesadoras de lácteos, queserías, mataderos) y en las heces de personas y animales sanos. Los porcentajes de vehiculización de listerias, estimadas en personas, varían mucho dependiendo de la fuente contaminante. *Listeria monocytógenes* infecta a muchas especies animales, además de a la especie humana.³¹

En ocasiones *Listeria monocytógenes* ha sido excretada con la leche. En la carne cruda del ganado de abasto, tanto de mamíferos como de aves, se encuentran a veces altos porcentajes de canales contaminadas. En las superficies húmedas de las plantas elaboradoras de alimentos se han encontrado listerias, lo que unido a la capacidad del microorganismo de crecer a temperaturas bajas, explica su presencia en frigoríficos industriales y domésticos, los límites de crecimiento de *Listeria monocytógenes*.²⁹

La prevención de la listeriosis humana empieza en las explotaciones ganaderas y en las tierras de cultivo, continúa durante la recolección de las cosechas y sacrificio de los animales en el matadero, sigue durante su acondicionamiento y transporte a las fábricas de productos alimenticios, continúa durante el procesado, almacenamiento, distribución y venta y acaba en la mesa del comedor de los consumidores. La aplicación de controles higiénicos reduce el riesgo de padecer listeriosis transmitida por los alimentos. Se trata de un caso clásico en el que debe aplicarse el sistema HACCP, desde el campo y la granja hasta el comedor, para reducir al mínimo el riesgo de la listeriosis humana por consumo de alimentos.^{8,15}

5.2.12.1 Explotaciones ganaderas.

Cuanto mejor planificados estén los tiempos de limpieza de los animales productores (de leche y/o carne), de eliminación de sus excrementos y de ordeño, tanto mejor será la calidad de la carne y de la leche que produzcan. Y es muy conveniente que la leche se mantenga en las granjas a temperaturas ≤ 4 °C hasta su transporte a las plantas de elaboración de productos lácteos.³⁰

5.2.12.2 Transporte.

Durante el transporte de los alimentos crudos, salvo que se protejan convenientemente con material impermeable al agua y al polvo, durante la carga y descarga de canales, cabe la posibilidad de contaminación de la carne, vía las manos (incluso con guantes) de los operarios que realizan este trabajo, que transfieren microorganismos de las superficies de unas canales a otras.³⁰

En el caso de las hortalizas, especialmente las que se utilizan por sus hojas (lechugas, acelgas.), las más externas suelen estar contaminadas debido a la tierra y polvo que contienen, de aquí la necesidad de su eliminación para evitar que las bacterias pasen desde estas hojas a las más internas. Si a todo lo expuesto sumamos que el transporte suele realizarse en vehículos frigoríferos, a temperaturas de 5 °C, o menores, este ambiente frío frenará el desarrollo de las bacterias mesófilas, pero no impedirá la multiplicación de *Listeria monocytógenes*, dada su psicofilia.³⁰

5.2.12.3 Plantas de procesado.

Listeria monocytógenes llega a las plantas de procesado alimentario con el polvo y la tierra que acompañan a los alimentos, con los calzados y los vestidos de los operarios. Los alimentos de origen animal contaminados también pueden actuar de vectores, lo mismo que los portadores humanos y animales sanos. Señalemos a este respecto que *Listeria monocytógenes* ha sido aislada en muestras fecales de personas sanas (2-6% de las analizadas); en enfermos el 21% excretaban 10^4 UFC/g de heces (o más) y el 18% de las personas que convivían con ellos eliminaban también *Listeria monocytógenes*.³⁰

Listeria monocytógenes se adhiere a diversos tipos de superficies (por ejemplo, acero inoxidable, vidrio y caucho) habiéndose encontrado biofilms en los equipos de las fábricas de alimentos lácteos. Las listerias sobreviven en los dedos después de lavadas las manos. En las plantas procesadoras de lácteos la fuente principal de *Listeria monocytógenes* la constituyen los pavimentos, aguas de lavado de suelos y paredes y los vertidos de leche refrigerada. Por ello el control debe centrarse en promover buenos métodos de pasteurización y en la identificación y eliminación de las fuentes contaminantes después del tratamiento de pasteurización.³⁰

5.2.12.4 Almacenamiento.

Listeria monocytógenes se ha puesto de manifiesto en una gran variedad de alimentos, tanto frescos como procesados. Durante el almacenamiento puede sobrevivir y multiplicarse en muchas materias primas alimenticias. La temperatura de almacenamiento de los alimentos es un factor importante que

influye en el riesgo de multiplicación de *Listeria monocytógenes* en los alimentos perecederos.³⁰

5.2.12.5 Distribución y puntos de venta.

Se deben aplicar las siguientes normas higiénicas básicas: a) mantener siempre separados los alimentos crudos de origen animal de los alimentos listos para comer; b) utilizar periódicamente y a intervalos convenientes, un método eficaz de limpieza y desinfección del equipo y utillaje empleados para cortar, picar y triturar las materias primas. Ello puede requerir un desmantelamiento previo de la maquinaria (picadoras, mezcladoras, etc.); c) los frigoríficos, armarios expositores, etc., deben disponer de sistemas que indiquen su temperatura y humedad del interior, sin necesidad de abrirlos; d) periódicamente se revisarán las fechas de entrada de los alimentos en los locales de venta y solo se expondrán en los lineales de los autoservicios aquéllos que se encuentren dentro de su vida útil, esto es, los que estén dentro del periodo en que se garantiza la inocuidad de su consumo.³⁰

5.2.12.6 Consumidores.

Para evitar la listeriosis en personas que se encuentren dentro del grupo vulnerable deberían seguir ciertas normas, como: no consumir alimentos de origen animal, crudos o poco cocinados, evitar la contaminación cruzada entre los alimentos crudos y los cocinados y listos para el consumo, las hortalizas se deben lavar bien y antes de ingerirlas, los frigoríficos se manipularán y prepararán de acuerdo con las más estrictas exigencias de las buenas prácticas de higiene, todos los alimentos deben prepararse siguiendo las instrucciones recomendadas por sus fabricantes, entre otros cuidados.³⁰

6. DISEÑO METODOLÓGICO.

6.1 Lugar de estudio.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Instituto SELADIS, ubicado en la Av. Saavedra, Zona Miraflores de la ciudad de La Paz, Bolivia.

6.2 Recolección de muestras para el estudio.

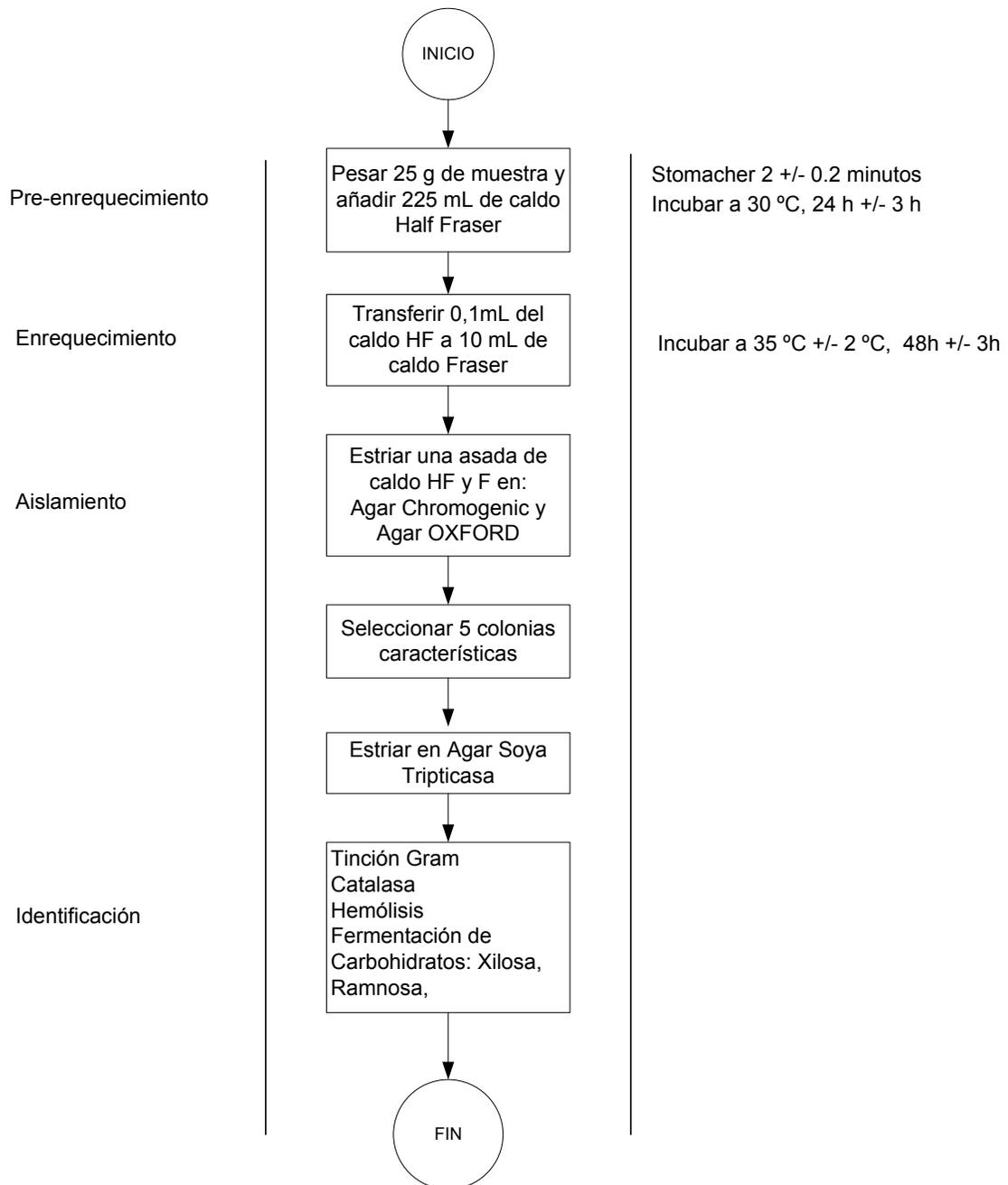
Se recolectaron 30 muestras de queso fresco elaborados artesanalmente, los cuales fueron adquiridos de diferentes puestos de venta del mercado Rodríguez de la ciudad de La Paz.

6.3 Tipo de estudio.

El presente trabajo se trata de un estudio descriptivo, puesto que está basado en verificar un método ya normalizado en condiciones propias de laboratorio de Microbiología de Alimentos del Instituto SELADIS.

6.4 Procedimiento.

PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE *Listeria monocytógenes* EN ALIMENTOS ISO 11290



Fuente. Microbiology of food and stuff. Horizontal method for the detection of *Listeria monocytógenes*. International Standard ISO 11290. ³²

6.4.1 Principio del método.

6.4.1.1 Enriquecimiento primario.

Este paso se realizó debido a que la mayoría de alimentos contienen células dañadas por algún tipo de tratamiento al que fueron sometidos para disminuir la población de microorganismos que existiesen en el alimento, en consecuencia necesitan un preenriquecimiento para permitir que esas células dañadas se recuperen. Para ello se empleó medios que contienen un elevado contenido de sustancias nutritivas y que junto a su capacidad tampón se pueda crear las condiciones óptimas para su crecimiento.³⁴

En este caso, se precedió a la siembra de la muestra en el medio de enriquecimiento líquido selectivo Caldo Half Fraser. Este medio, originalmente de coloración amarillo, vira a un color negro o gris en presencia de microorganismos, como cepas de *Listeria* spp, capaces de hidrolizar la esculina (contenida en el medio) a esculina, metabolito que reacciona con los iones férricos del citrato férrico de amonio, el cual es el responsable del oscurecimiento del medio.³⁴

6.4.1.2 Enriquecimiento secundario.

A partir del anterior caldo, se inoculó al medio de enriquecimiento líquido selectivo Caldo Fraser. El cual contiene los mismos componentes que el caldo Half Fraser. Por lo tanto, el fundamento es el mismo.

6.4.1.3 Estriado en placa e identificación.

A partir de los anteriores cultivos obtenidos se estrió en los dos medios sólidos selectivos: Agar Chromogenic y Agar OXFORD.

6.4.1.3.1 Chromogenic Listeria Agar ISO Base.

Es un medio selectivo para el aislamiento e identificación presuntiva de *Listeria* spp. y *Listeria monocytógenes* en alimentos, recomendado por la ISO 11290. Su fundamento se basa en que el nitrógeno, vitaminas, aminoácidos y minerales son proporcionados por la peptona y caseína. El extracto de levadura proporciona las vitaminas B. El cloruro de Sodio brinda el equilibrio osmótico. Mientras que el Piruvato de Sodio actúa como fuente de energía y revivifica las bacterias. Este medio incorpora como hidrato de carbono fermentable la glucosa. El Cloruro de Litio, Polimixina B, Ácido nalidíxico, Anfotericina y Ceftazidima proporcionan selectividad al medio, inhibiendo en gran medida el crecimiento de microorganismos acompañantes. Finalmente, el sustrato cromogénico detecta la enzima β -glucosidasa, común en todas las especies de *Listeria*, virando sus colonias a color azul y el sustrato Lipasa C es el responsable del halo color blanco opaco que rodea de forma característica a las *Listeria monocytógenes* diferenciándola del resto de *Listerias* spp.³⁴

6.4.1.3.2 Agar Oxford

Este medio de cultivo base permite el desarrollo de *Listeria* spp, debido a que el producto de hidrólisis de la esculina en presencia de iones Fe^{3+} forma un compuesto fenólico de color negro. Con la adición del suplemento selectivo se logra un crecimiento apropiado y una clara visualización de las colonias de

Listeria spp., mientras que se inhibe total o parcialmente el desarrollo de la flora acompañante presente en la muestra en estudio.³⁴

6.4.1.4 Aislamiento.

Las colonias sospechosas de *Listeria monocytogenes* obtenidas en los anteriores medios selectivos fueron aisladas en Agar Soya tripticasa Extracto de Levadura al 0.6 % para su posterior identificación bioquímica.

6.4.1.5 Confirmación.

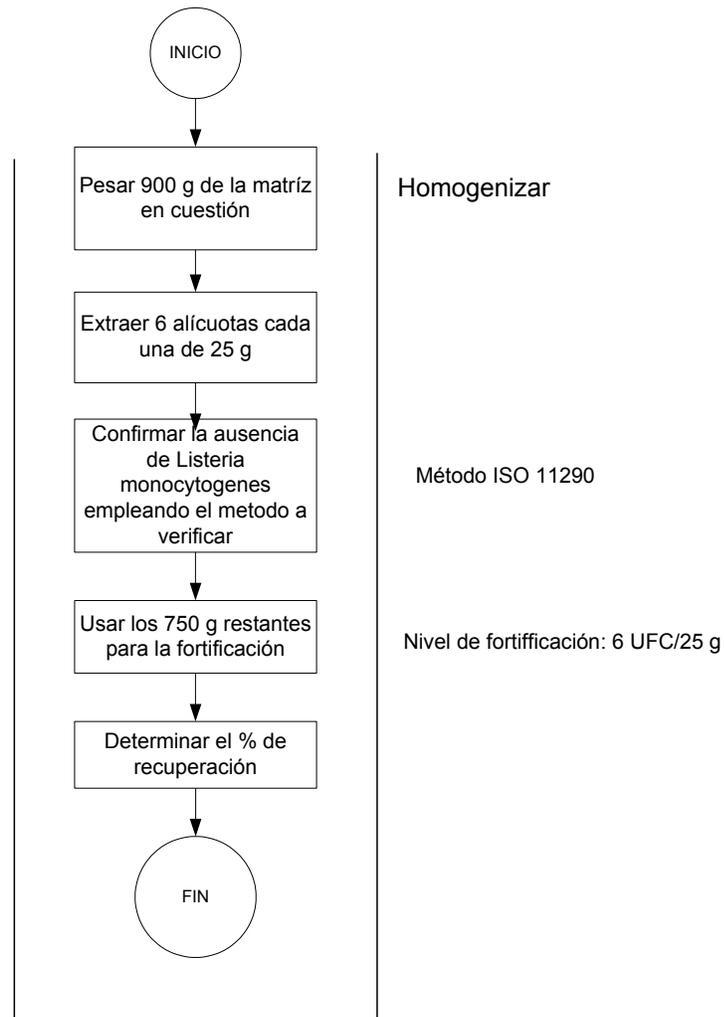
De acuerdo a las características morfológicas de las colonias en anteriores medios selectivos se precedió a la identificación bioquímica de las colonias sospechas de *Listeria monocytogenes*.

- **Tinción GRAM.** Se realizó una tinción Gram a partir de las colonias presentes en el agar soya tripticasa extracto de levadura 0.6%. Es así que todas las especies de *Listeria* son bacilos cortos gram positivo.
- **Prueba de la Catalasa.** Sobre una lámina de vidrio se colocó una gota de solución de peróxido de hidrógeno al 3 % y con un palillo de madera se suspendió en ella una colonia sospechosa. La formación inmediata de burbujas indicó que la prueba era positiva.³⁴ Las especies de *Listeria* son catalasa positivo

- **Observación de hemólisis.** Se tomó una pequeña porción de colonia y se estrió sobre la base de agar sangre de carnero 5%, luego de 24 horas de incubación se observó la reacción hemolítica, en donde *Listeria monocytógenes* muestra una zona clara (no tan definida) de beta hemólisis.
- **Fermentación de Carbohidratos.** Se inoculó una asada de cultivo de colonias sospechosas en caldos de fermentación de carbohidratos, los cuales originalmente son de coloración púrpura (Xilosa, Ramnosa y Manitol), luego de 5 a 7 días de incubación, una coloración amarilla indica prueba positiva. Reacción típica de *Listeria monocytógenes* que únicamente fermenta la Ramnosa a diferencia de las demás especies que son negativas.

6.5 Limite de detección.

PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE DETECCIÓN



6.6 Verificación del método.

La verificación del método se basa en aplicar el método ISO 11290 en una población (estadísticamente representativa) de muestras naturales donde se sospecha la presencia del microorganismo.

7. MATERIAL Y EQUIPOS.

7.1 Medios de cultivo y reactivos.

Los medios de cultivo de enriquecimiento, aislamiento e identificación requeridos por la norma International Standard ISO 11290 para la detección de *Listeria monocytógenes*.

7.2 Equipos.

Los necesarios para realizar procedimientos microbiológicos, bajo condiciones controladas de tiempo y temperatura.

8. RESULTADOS.

Tabla N° 5. Determinación del límite de detección del método International Standard ISO 11290 para la detección de *Listeria monocytógenes* en queso fresco fortificado.

N°	Resultado	N°	Resultado
1	Presencia en 25 g	16	Presencia en 25 g
2	Presencia en 25 g	17	Presencia en 25 g
3	Presencia en 25 g	18	Ausencia en 25 g
4	Presencia en 25 g	19	Presencia en 25 g
5	Presencia en 25 g	20	Presencia en 25 g
6	Presencia en 25 g	21	Presencia en 25 g
7	Presencia en 25 g	22	Presencia en 25 g
8	Presencia en 25 g	23	Presencia en 25 g
9	Presencia en 25 g	24	Presencia en 25 g
10	Presencia en 25 g	25	Presencia en 25 g
11	Presencia en 25 g	26	Presencia en 25 g
12	Presencia en 25 g	27	Presencia en 25 g
13	Presencia en 25 g	28	Presencia en 25 g
14	Presencia en 25 g	29	Presencia en 25 g
15	Presencia en 25 g	30	Presencia en 25 g

Se observa que de 30 alícuotas de queso fresco fortificadas, en 29 se detectó la presencia de *Listeria monocytógenes*, habiéndose establecido que el límite de detección del método ISO 11290 es de 6 UFC/25 g.

Porcentaje de recuperación del analito en la matriz selecciona.

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{n}^\circ \text{ Pos} \times 100}{30}$$

Donde n° Pos: Número de muestras positivas

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{29 \times 100}{30}$$

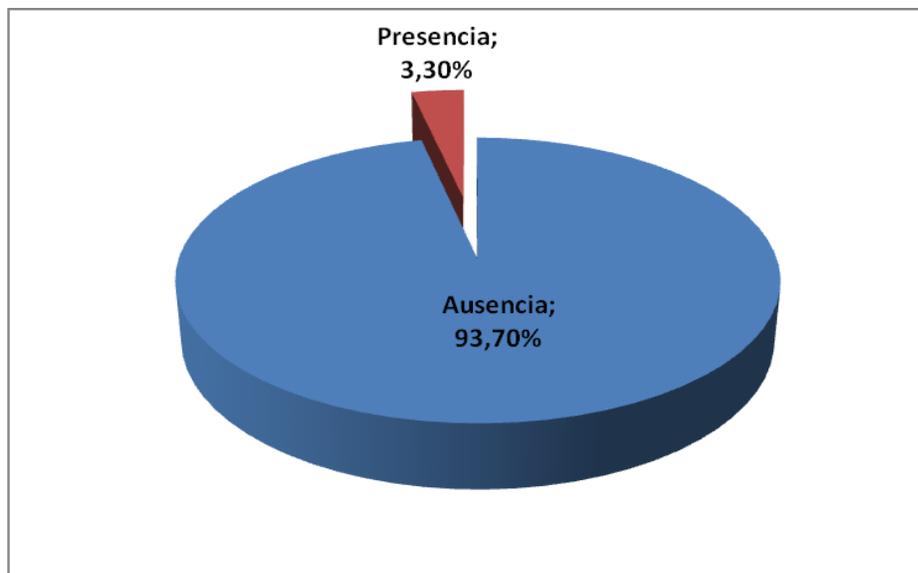
% Recuperación = 97.8 %

Tabla N° 6. Presencia de *Listeria monocytógenes* en quesos frescos sin fortificar, recolectados del mercado Rodríguez de la ciudad de La Paz.

N°	RESULTADO	N°	RESULTADO
1	Ausencia en 25 g	16	Ausencia en 25 g
2	Ausencia en 25 g	17	Ausencia en 25 g
3	Ausencia en 25 g	18	Ausencia en 25 g
4	Ausencia en 25 g	19	Ausencia en 25 g
5	Ausencia en 25 g	20	Ausencia en 25 g
6	Ausencia en 25 g	21	Ausencia en 25 g
7	Ausencia en 25 g	22	Ausencia en 25 g
8	Ausencia en 25 g	23	Ausencia en 25 g
9	Ausencia en 25 g	24	Ausencia en 25 g
10	Ausencia en 25 g	25	Ausencia en 25 g
11	Ausencia en 25 g	26	Ausencia en 25 g
12	Ausencia en 25 g	27	Ausencia en 25 g
13	Ausencia en 25 g	28	Ausencia en 25 g
14	Presencia en 25 g	29	Ausencia en 25 g
15	Ausencia en 25 g	30	Ausencia en 25 g

Se aplicó el método International Standard ISO 11290 para la detección de *Listeria monocytógenes* en 30 muestras de quesos frescos (elaborados artesanalmente) recolectados del mercado Rodríguez de la ciudad de La Paz.

Figura N° 4. Presencia de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos sin fortificar, recolectados del mercado Rodríguez de la ciudad de La Paz.



Se aplicó el método International Standard ISO 11290 para la detección de *Listeria monocytogenes* en 30 muestras de quesos frescos recolectados del mercado Rodríguez de la ciudad de La Paz. Se observó que de las 30 muestras de quesos frescos, el método a verificar detectó la presencia de *Listeria monocytogenes* en un 3.3% (Un caso).

9. DISCUSIÓN.

Listeria monocytógenes es un patógeno alimentario que causa una mayor preocupación en la industria alimentaria, debido a su alto índice de morbi-mortalidad y a su capacidad para sobrevivir en condiciones adversas, que resultaría imposible para otros microorganismos, incluso posee la capacidad para formar biofilms y desarrollar tolerancia a los desinfectantes empleados, los que constituyen una fuente de contaminación crónica en la industria afectada.

Por estas razones, el control de este patógeno requiere un adecuado diseño higiénico de las instalaciones, el empleo de técnicas apropiadas para la detección de patógenos y la mejora de las prácticas de limpieza y desinfección en la industria alimentaria. Estas actuaciones contribuyen a minimizar la presencia de cepas persistentes y permiten una mayor garantía de higiene y seguridad en los alimentos. Cabe resaltar que la contaminación de la materia prima también puede desencadenarse a partir de los materiales que se emplea para la recolección de leche. En consecuencia, es necesario que los productores adopten medidas adecuadas que permitan eliminar o reducir al mínimo las principales fuentes de contaminación.

Debido a que *Listeria monocytógenes* se encuentra ampliamente distribuida en el medio ambiente y existen varios estudios en donde ha sido aislada de varios tipos de fuentes como por ejemplo, en vegetales crudos, cárnicos, utensilios y equipos de la industria alimentaria, pero la mayoría de los trabajos revisados se centran fundamentalmente en productos listos para el consumo que generalmente se conservan durante largos períodos a temperaturas de refrigeración, es decir en lácteos y sus derivados, como ser quesos y helados. Es por esta razón, la elección de la matriz seleccionada en el presente trabajo.

A la vez, se han diseñado varios métodos convencionales para la detección de *Listeria monocytógenes* a partir de alimentos que han ganado aceptación con propósitos reglamentarios internacionales, entre ellos se mencionan: el método de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA), el método oficial de la Asociación Oficial de Químicos Analistas (AOAC), el método del Servicio de Inspección y Seguridad Alimentaria (FSIS) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) y los Estándares ISO 11290. Sin embargo, dependiendo de la naturaleza de la muestra, un método particular puede ser más adecuado que otro. Por ejemplo, los métodos de la FDA y de la AOAC pueden utilizarse para el análisis de la leche y los productos lácteos, el método del USDA-FSIS se recomienda para la carne roja y carne de ave (cruda o lista para comer), huevos y derivados y hasta muestras medioambientales. Debido a lo anterior, el Comité Técnico de la Organización Internacional para la Estandarización ISO/TC de Productos Agroalimentarios, afirma que el Estándar ISO 11290, es el recomendado para la detección de *Listeria monocytógenes* en una gran variedad de productos alimenticios. Por esta razón es que el presente trabajo se basa en verificar el método mencionado.

En muchos trabajos de investigación donde se evalúa la presencia de este microorganismo en quesos, como el realizado por Gonzales en Maracaibo, Venezuela el 2009, el cual detecta la presencia de *Listeria monocytógenes* en una muestra de las 48 analizadas, empleando el método ISO 11290, se pudo observar que logró identificar otras cepas de listeria, lo que en nuestro trabajo no se estudia debido a que *Listeria monocytógenes* es la única especie considerada patógena para el hombre.

Similar resultado se observó, cuando Ramirez y colaboradores en Venezuela el 2010 encontraron 2 cepas positivas en 30 muestras de quesos y que a la vez destacó la presencia de otras cepas de listeria. La similitud entre estas

investigaciones y la nuestra esta en el número de muestras analizadas. Sin embargo, el porcentaje de recuperación del agente es similar. Por otro lado, el método aplicado tanto en dichas investigaciones como en la nuestra, no fue modificado, debido a que el mismo es una norma internacional. Además que se tiene conocimiento que en nuestro país, la detección de *Listeria monocytógenes*, en ciertos alimentos es un requisito microbiológico obligatorio, tal como lo indica el Instituto de Normalización Boliviana (IBNORCA).

En cuanto al límite de detección del método, no se pudo encontrar estudios que evalúen este valor, sin embargo en nuestro trabajo se determinó que el método, bajo las condiciones del Laboratorio de Microbiología, no detecta menos de 6 UFC, considerando que teóricamente el límite de detección en la verificación de métodos cualitativos normalizados debe ser de 3 UFC. El valor encontrado nos lleva a suponer que probablemente se deba controlar con exactitud el peso de la muestra y los tiempos de incubación en cada una de las etapas del proceso.

10. CONCLUSIONES.

- Al realizar la verificación del método International Standard ISO 11290 se llegó a la conclusión que el método es aplicable para la detección de *Listeria monocytógenes* en muestras de quesos frescos.
- Se determinó el límite de detección del método International Standard ISO 11290, encontrando que el método es capaz de detectar una concentración de igual o mayor número a 6 UFC/25 g del analito en cuestión.
- Se determinó un porcentaje de recuperación de 97.8% empleando un nivel de fortificación de 6 UFC/25gr.
- Se aplicó el método International Standard ISO 11290, con un hallazgo del 3.3 % de muestras contaminadas naturalmente por el agente de interés, es decir, un caso.

11. RECOMENDACIONES.

Debido a la naturaleza ubicua de *Listeria monocytógenes*, el microorganismo puede representar un “mayor peligro” en aquellos alimentos que no están sujetos a un proceso que reduzca o elimine el microorganismo, es decir los alimentos listos para su consumo y en este grupo se encuentran los quesos que están incluidas en la dieta diaria del hombre.

En el presente trabajo, el principal requisito para dar inicio a la verificación fue encontrar las condiciones óptimas del laboratorio, que incluye, contar con la disponibilidad de equipos y su buen funcionamiento y contar con personal capacitado, ya que de esta manera se aseguraría la obtención de resultados confiables.

Como en cualquier procedimiento microbiológico, es necesario incluir controles, tanto de medio de cultivo como de ambiente, ya que una contaminación de éstas generaría resultados falso positivos, y en consecuencia, los resultados posteriores no serían los verdaderos.

Si bien uno de los aspectos más relevantes del presente trabajo es lograr ofertar la prueba a clientes de la industria alimentaria, pudimos evidenciar que la marcha analítica demora entre 10 a 12 días de análisis, además que el personal tiene que poseer la capacidad de discriminar entre una colonia sospechosa de otra que no lo es, éste es el punto crucial para obtener resultados confiables.

Es así que en base a lo obtenido en el presente trabajo, es recomendable que se pueda determinar la incidencia o prevalencia de *Listeria. monocytógenes* en otros productos alimenticios implicados en la transmisión de dicho patógeno, ya que nuestro país no cuenta con información de este tipo.

Por otro lado, sería un valioso aporte la comparación del método ISO 11290 con una técnica molecular, debido a que estas últimas presentan mayor sensibilidad, especificidad y acortan el tiempo de análisis, de esta manera se ofertaría nuevas alternativas de análisis microbiológico en alimentos.

12. BIBLIOGRAFÍA.

1. Análisis Epidemiológico de Enfermedades de Transmisión Alimentaria. Venezuela. Enero 2011 – junio 2012.
2. Roberto Olivares. Revista Biomédica MEDWAVE. *Listeria monocytogenes*: bacteria antigua, desafío permanente. Vol.1. 2010
3. Michanie S. *Listeria monocytogenes*: la bacteria emergente de los 80. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. Marzo de 2008.
4. Reglamento Técnico Centroamericano. Alimentos. Criterios microbiológicos para la inocuidad de los alimentos. RCTA 67:04:50:08. Año 2011.
5. López, L. y Espinosa, L. La inocuidad de los alimentos, primera etapa de la nutrición saludable. Alim. Nutri. Salud. Pag. 35-42. Año 2014.
6. Cabrera S. *Listeria monocytogenes*: un nuevo reto para el Sector Alimentario. Año. 2009.
7. Schöbitz R, Marín M, Horzella M. Presencia de *Listeria monocytogenes* en leche cruda y quesos frescos artesanales. Agro Sur. Año 2001.
8. Revisión bibliográfica. Enfermedades Diarreicas Agudas: consejos, tratamiento y prevención. Vol.1. N°2. Santa Cruz, Bolivia. Año 2013.
9. Lanza Arias Kattia. Aislamiento de *Listeria monocytogenes* en leche y queso fresco. Boletín Informativo-microbiología de Alimentos INLASA. Bolivia. Año 2004.
10. Ennis Rodríguez González, Lilibeth Cabrera Salas, Gisela Colina Phillips. *Listeria monocytogenes* en queso amarillo madurado tipo Edam y su resistencia al pH y salinidad. Año 2009.

11. Luís Guillermo Ramírez Mérida, Alba Morón de Salim, Ana Yudith Alfieri Graterol, Orlando Gamboa. Detección de *Listeria monocytógenes* en queso blanco criollo, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Venezuela. Año 2010, Volumen 60 - Número 3.
12. Cristóbal, D. R. L., Maurtua T. D. J. Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima, Perú, y la supuesta acción bactericida de *Lactobacillus* spp. Revista Panamericana de Salud Pública. Año 2009.
13. <http://www.emol.com/noticias/nacional/2013/04/29/596056/salud-retira-del-mercado-marca-de-quesos-blandos-responsable-del-brote-de-listeriosis>
14. Plaza Ibarra, Luis Antonio. Análisis microbiológico en quesos frescos que se expenden en supermercados de la ciudad de Guayaquil, determinando la presencia o ausencia de listeria y salmonella. Ecuador. Año 2013.
15. Dubón Pérez, Juan Carlos. Determinación de la presencia de *Listeria monocytógenes* en quesos frescos artesanales que se expenden en mercados municipales de la ciudad de Guatemala. Año 2014
16. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, et al. Diagnostico Microbiológico. Buenos Aires, Argentina. 6ta Ed. Año 2008.
17. Codex Alimentarius. Anteproyecto de Directrices para el control de *Listeria monocytógenes* en alimentos. Comité del Codex sobre Higiene de los alimentos. Apéndice IV. Año 2009.
18. Bover Sara, Garriga Margarita. Condiciones que determinan el crecimiento y la supervivencia de *Listeria monocytógenes* en alimentos listos para el consumo. Año 2014.
19. Ana Isabel Muñoz, Mercedes Vargas, Ligia Otero, Graciela Díaz, Viviana Guzmán. Presencia de *Listeria monocytógenes* en alimentos listos para

- el consumo, procedentes de plazas de mercado y en supermercados de cadena, Bogotá, D.C, Años 2002-2008.
20. Meljem J. Método de prueba microbiológico para alimentos: determinación de *Listeria monocytogenes*. Norma Oficial Mexicana NOM-143-SSA1-1195. Bienes y Servicios. México, Distrito Federal. 2009.
 21. Fuster Valls. Importancia del control higiénico de las superficies alimentarias mediante técnicas rápidas y tradicionales para evitar y/o minimizar las contaminaciones cruzadas. 2006.
 22. Espinoza A, De la Torre M, Salinas M. Determinación de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos de producción artesanal que se expenden en los mercados del Distrito de ICA. Peru. Enero – Marzo. Año 2009.
 23. Blanco MM. Recuperación de *Listeria monocytogenes* dañada subletalmente por efecto de la congelación. España: Universidad Complutense de Madrid. Año 1994.
 24. Torrez Kirvis, Sierra Sara. Patogénesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonótico emergente. Revista de Cordova. Vol. 10 N°1. Junio. Año 2010
 25. Quirós E. Impacto de la Calidad e Inocuidad de los Productos Lácteos en el Comercio Internacional. Guatemala. 2003.
 26. María A. Díaz Pinillos; Milciades Chávez Castillo; Elmo A. Saucedo Amaya Revista “*Ciencia y Tecnología*”, Escuela de Postgrado - UNT *Listeria monocytogenes* en leche y queso fresco como vehículo transmisor de listeriosis humana en la Provincia de Trujillo, Perú. Año 2009.
 27. Curtis ML, Franceschi O, De Castro M. *Listeria monocytogenes* en vegetales mínimamente procesados. Caracas, Venezuela. ALAN 2002.

28. Reuben A, Treminio H, Arias ML, Chávez C. Presencia de *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp.*, en alimentos de origen animal 2003.
29. Mayorga MA. Presencia de *Listeria monocytogenes* en leche cruda de tanques de frío en lecherías y tanques comunitarios provenientes de 9 sectores de la provincia de Cautín, IX Región. Chile: Universidad Católica de Temuco, 2004.
30. Carrascal Ana Maria, Castaño Maria Victoria y colab. Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en queso fresco en Colombia. Año 2011
31. Sánchez, I. Guerra de quesos: artesanal vs. industrial. Sección Reportajes. Revista Appetit. 11 de julio de 2014.
32. Microbiology of food and animal feeding stuff. Horizontal method for the detection of *Listeria monocytogenes*. International Standard ISO 11290. 2da Ed. Revisado 2009.
33. Gálvez EM. Determinación de la contaminación por *Listeria monocytogenes* en quesos de producción comercial en Guatemala usando el método USDA. Guatemala. Año 2009.
34. Calderón Vicente y Pascal. Microbiología Alimentaria. Metodología Analítica para alimentos y bebidas. 2da Ed. 2008
35. Frasier WC, Westhoff DC. Microbiología de los Alimentos. 3ra Edición. Año 2003.

ANEXO 1

Composición de medios de cultivo

Tabla N° 7. Composición Caldo Fraser

Peptona proteosa	5 g
Triptona	5 g
Cloruro de sodio	20 g
Fosfato diácido de Potasio (KH ₂ PO ₄)	12 g
Fosfato ácido de Disodio (Na ₂ HPO ₄)	1,35 g
Esculina	1 g
Cloruro de Litio	3 g
Citrato de Amonio Férrico	250 mg
Acriflavina	12,5 mg
Acido Nalidixico	10 mg

Tabla N° 8. Composición Agar Chromogenic Listeria Agar ISO Base

Digestivo enzimático de tejido animal	18 g
Digestivo enzimático de caseína	6 g
Extracto de levadura	10 g
Piruvato de sodio	2 g
Glucosa	2 g
Glicerofosfato de Magnesio	1 g
Sulfato de Magnesio	0,5 g
Cloruro de Sodio	5 g
Cloruro de Litio	10 g
Fosfato ácido de Disodio (Na ₂ HPO ₄)	2,5 g
5-Bromo-4-Cloro-3-Indol-β-D-Glucopiranosido	0,05 g
Agar	12 g
Acido Nalidixico	10 mg
Plimixina B	38,350 IU
Anfotericina	5 mg
Ceftacidima	10 mg

Tabla N° 9. Composición Agar OXFORD.

Agar sangre base	39 g
Esculina	1 g
Citrato de amonio férrico	0,5 g
Cloruro de Litio	15 g
Anfotericina B	5 mg
Sulfato de Colistina	10 mg
Acriflavina	2,5 mg
Cefotetan	1 mg
Fosfomicina	5 mg

Tabla N° 10. Composición Agar Soya Tripticasa Extracto de Levadura.

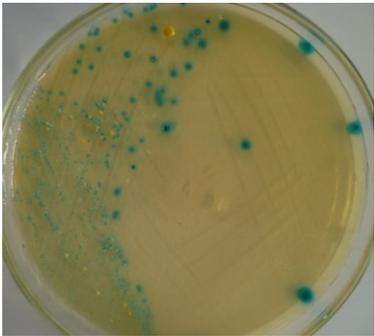
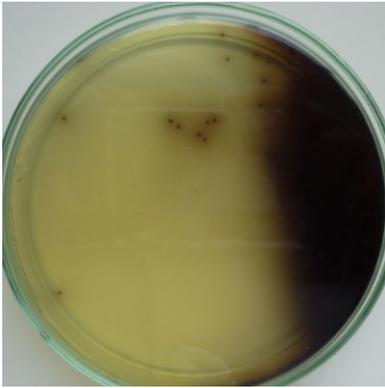
Digestivo pancreático de caseína	15 g
Digestivo enzimático de	5 g
Cloruro de Sodio	5 g
Agar	15 g
Extracto de levadura	0,6 %

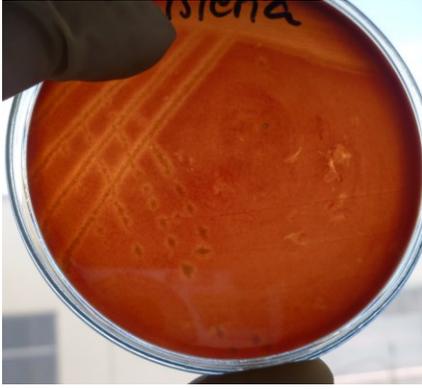
ANEXO 2

Formulario de Registro de Datos Analíticos

ANEXO 3

Fotografías de medios de cultivo y pruebas confirmatorias

	CONTROL DE MEDIO DE CULTIVO	MEDIO DE CULTIVO CON DESARROLLO
CALDO HALF FRASER		
CALDO FRASER		
AGAR OCLA		
AGAR OXFORD		

<p>PRUEBA DE LA CATALASA (Positivo)</p>	
<p>TINCIÓN GRAM (Bacilos Gram Positivo)</p>	
<p>Test de hemolisis (β – hemólisis)</p>	
<p>FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS Xilosa (-) Ramnosa (+) Manitol (-)</p>	